昆虫学报 *Acta Entomologica Sinica*，December 2007，50(12)：1212－1218　ISSN 0454-6296

家蝇幼虫抗菌肽 MDL-2 的电泳制备及其抗菌作用机理

宫　霞[1]，胡树凯[2]，乐国伟[3]

（1.上海商学院食品学院，上海　200235；2.山东商务职业技术学院，山东烟台　264025；
3.江南大学食品学院，江苏无锡　214036）

摘要：通过体壁损伤和感染大肠杆菌同时诱导家蝇 *Musca domestica* 幼虫产生免疫血淋巴，经沸水浴热变性，透析浓缩处理，然后经 Tricine-SDS-PAGE 得到诱导前后家蝇幼虫血淋巴中蛋白差异表达条带，将该条带电泳回收，复性，抗菌活性检测等步骤，分离纯化得到抗菌肽 MDL-2，其分子中富含 Pro，Gly 和碱性氨基酸，分子量为 11 kD，对革兰氏阴性菌 *Escherichia coli* 和革兰氏阳性菌 *Staphylococcus aureus* 均有较强抗性，因此电泳制备抗菌肽的方法为此类生物微量活性物质的分离纯化提供一种行之有效的途径。通过 MDL-2 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌通透性和透射电镜超微结构的图谱分析，MDL-2 首先与细菌的外膜结合，然后抗菌肽形成柔性的两亲空间构象与细胞内膜作用，扰乱了膜脂分子的排列，改变了细胞膜的通透性，影响细胞膜的结构和功能，细胞膜上形成了许多孔道，同时造成细胞内的原生质扩散，并从孔道向胞外渗漏，影响了细菌的代谢系统，最终引起细胞膜破碎，细胞完全解体，从而起到抑菌杀菌作用。

关键词：家蝇；抗菌肽；电泳制备；超微结构；抗菌机理

中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2007)12-1212-07

Electrophoretic preparation and antibiosis mechanism of antibacterial peptide MDL-2 from *Musca domestica* larvae

GONG Xia[1], HU Shu-Kai[2], LE Guo-Wei[3] (1. Department of Food Science, Shanghai Business School, Shanghai 200235, China; 2. Shandong Business Vocational Institute, Yantai, Shandong 264025, China; 3. School of Food Science, Southern Yangtze University, Wuxi, Jiangsu 214036, China)

Abstract: The immunized hemolymph was produced from *Musca domestica* larvae by the induction of injury and bacteria infection. The antibacterial peptide was purified by means of boiled water bath, dialysis and concentration, Tricine-SDS-PAGE preparation, retrieval and renaturing of peptides. The result of amino acid analysis showed that the molecule weight of antibacterial peptide (MDL-2) was 11 kD. It contained abundant Pro, Gly and alkaline amino acids, which had activity against Gram-positive bacteria, *S. aureus* and Gram-negative bacteria, *E. coli*. Electrophrosis was proved an effective way to prepare antibacterial peptides. The circular dichroism spectra of antibacterial peptide MDL-2 in different solutions was analyzed. The antibacterial mechanism was primarily studied through observing permeability and morphological changes of bacterial cells. The results showed that MDL-2 caused a series of pathological changes to bacteria. Transmisson electron microscopy showed that MDL-2 was located in the plasma membrane. MDL-2 combined with bacterial cells by static electricity gravitation at the early stage, then resulted a flexible amphipathic spatial conformation, interacted with the plasma membrane, disturbed ordered arrangement of membrane lipid and changed permeability, thus irregular holes appeared on the plasma membrane and the cytoplasmic contents leaked out, so that metabolism system of bacteria was disturbed. Finally, bacteria were disintegrated into small fragments and died.

Key words: *Musca domestica*; antibacterial peptide; electrophoretic preparation; ultrastructure; antibacterial mechanism

---

基金项目：中央级科研院所基础性专项资金工作项目重点项目(2001DEA-20022)

作者简介：宫霞，女，1966 年生，山东人，博士，教授，主要从事生物活性物质的研究，E-mail：gongxia11@tom.com

收稿日期 Received：2007-04-19；**接受日期** Accepted：2007-09-05

昆虫抗菌肽或抗菌蛋白是昆虫在诱导和非诱导情况下，产生的具有体液免疫功能的小分子物质，参与机体对入侵病原微生物的免疫反应。该物质分子量较小，对热稳定，与抗生素的抗菌机理完全不同，已成为转基因抗病动植物的基因来源和新型抗菌、抗癌药物研究开发的目标，有着广阔的发展前景（宫霞等，2002）。

家蝇 *Musca domestica* 属于双翅目环裂亚目蝇科家蝇属，从幼虫到成虫都生活在杂菌横生的污浊环境中，有着极强的适应恶劣环境的生存能力，预示着它们体内存在着独特的免疫防御机制，具有很高的理论和潜在的应用价值。迄今为止以家蝇幼虫为实验材料分离抗菌肽（蛋白）的研究，国外未见报道，国内对家蝇抗菌物质的研究进展缓慢，长期停留在免疫应答（饶军华和周永富，1999）及血淋巴理化性质（王程远和左晓峰，1997）的阶段。宫霞等（2004）报道了从家蝇幼虫免疫血淋巴中分离得到的抗菌肽 MDL-1 的分离纯化和抑菌杀菌作用。本研究从家蝇幼虫免疫血淋巴中分离得到了抗菌肽 MDL-2，检测了其氨基酸组成和生物活性，并进行了圆二色谱和红外光谱分析，结果表明 MDL-2 无论从氨基酸数量、组成、分子量还是空间结构上与已报道的家蝇抗菌肽（陈留存和王金星，2001；柏鸣和周立，2001；盛长忠等，2002；屈军梅等，2007）均不相同，目前可以推断抗菌肽 MDL-2 是新型的富含 Pro 抗菌肽，并在此基础上进行抗菌肽 MDL-2 对大肠杆菌通透性及超微结构的作用研究，初步分析了该抗菌肽的抗菌机理。

1　材料与方法

1.1　家蝇幼虫与菌株

3 龄家蝇幼虫由无锡昆龙生态生物环保有限公司提供。大肠杆菌 *Escherichia coli* ATCC25922 和金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* ATCC6538 由无锡市疾病预防控制中心提供。

1.2　仪器与试剂

DY-A 电泳仪，高速组织捣碎机，Waters600/500 高效液相色谱仪，Ag1100 氨基酸色谱仪，UV755B 紫外分光光度计，GL-16G-II 冷冻离心机，650-60 荧光分光光度计，日本日立公司产品；JASCO J-715 圆二色谱仪，日立 H-7000 型透射电子显微镜。

丙烯酰胺为 Canalab 产品，N，N′-甲叉双丙烯酰胺（分析纯）为 Biomol 公司产品；Tricine 为 Amresco 公司产品；过硫酸铵和 TEMED 为 BIB 产品；低分子量标准蛋白质为上海生化所监制；胰岛素（40 U/mL）为上海生物化学制药厂产品；透析袋为 Sigma 公司产品。

1.3　抗菌肽的分离纯化

1.3.1　家蝇幼虫的免疫：用带有大肠杆菌的小针斜刺幼虫的腹腔，一针一条，刺伤后继续饲养 24 h，同时设立对照组（只饲养不进行诱导）。将虫体与饲料剥离，立即放入液氮速冻。

1.3.2　血淋巴的提取：将一定量虫体放入高速组织捣碎机中，按重量/体积（1∶3）加入提取液（0.05 mol/L 乙酸铵缓冲液 pH 5.0，35 μg/mL PMSF），充分捣碎，匀浆用 12 000 r/min 高速冷冻离心 30 min，取上清液，重复 3 次，合并上清；用 400 目纱网过滤，得滤液。将滤液于沸水浴中搅拌加热 5 min，迅速冷却后，4 800 r/min 离心 30 min，上清液用截流 2000Da 透析袋透析浓缩，将浓缩液 -20℃冰箱保存备用。

1.3.3　抗菌肽的电泳制备：首先，寻找家蝇幼虫诱导前后蛋白表达差异条带，将免疫的血淋巴和对照组未免疫的血淋巴分别与上样缓冲液加热处理后，进行 Tricine-SDS-PAGE，参照 Schagger 和 von Jagow（1987）的方法并进行改进，分离胶浓度 16.5%，间隙胶浓度 6.2%，浓缩胶浓度 4%，胶联度 3%，胶厚 1.5 mm，电压 60 V，电流 30 mA，电泳 6 h，将凝胶银染色。其次，（1）回收：将蛋白凝胶剪碎，加入适量的 Tris-HCl 缓冲液 pH 7.0，浸泡，然后放入 2000 Da 透析袋进行洗脱电泳，电压 60 V，时间 3 h，400 目纱网过滤，得滤液，向滤液中滴加乙酸使 pH 5.5，然后离心得抗菌肽，室温干燥。但部分肽已变性，其水溶性较差，必需进行复性。（2）复性：将干燥的肽中加入 pH 8.0 TE 缓冲液和终浓度为 0.5 mol/L 的盐酸胍，振荡均匀，-4℃静止 24 h，肽得以复溶、复性后，再经抗菌活性及纯度的检验。

1.4　抗菌活性的检测

采用 2 种方法：（1）抑菌圈测量法：通过测定抑菌圈直径，定性检测抑菌活力；（2）比浊法：参照 Hultmark（1980）的方法并计算抗菌活力，$U=(OD_0-OD)/OD_0$，其中 U 为抑菌活力单位，OD_0 为初始的吸光值，OD 为作用 30 min 后的吸光值。

1.5　蛋白浓度与抗菌肽浓度的测定

血淋巴中蛋白浓度测定参照 Bradford 检测方法（汪家政，2001）；抗菌肽浓度测定参照 Steiner（1982）方法。

1.6　纯度鉴定

采用 HPLC 鉴定，分析型 C^{18} 反相柱，流动相 A：0.05% TFA，B：70% 乙晴（含 0.05% TFA），线性梯度洗脱，流速 1 mL/min，检测波长 220 nm。

1.7　抗菌肽分子量测定

采用 Tricine-SDS-PAGE 不连续电泳测定，分离胶浓度 14%，间隙胶浓度 6%，浓缩胶浓度 4%，胶联度 3%，胶厚 0.7 mm。考虑到抗菌肽分子量实际情况，在测定时添加胰岛素作为分子量标准。

1.8　氨基酸组成分析

样品加 6 mol/L 盐酸真空封管，水解 24 h 后，用氨基酸分析仪测定。

1.9　抗菌肽圆二色性分析

使用 Jasco J-715 圆二色谱仪于室温 25℃下检测，抗菌肽水溶液浓度为 0.15 mg/mL，调节 SDS 浓度为 1%，3%，分别扫描 CD 光谱，并进行二级结构构象单元分析（参数：Ch2-mode，HT；Resolution，0.2；Bandwidth，1.0 nm；Sensitivity，20mdeg；Response，0.5 s；Speed，100 nm/min；Accumulation，4；Range，250 ~ 190 nm）。

1.10　抗菌肽 MDL-2 对细菌细胞通透性的影响

参考 Laura 等（1996）方法并进行改进。培养细菌至对数生长期，1 000 r/min 离心 10 min，沉淀菌体用 0.1 mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液稀释为 $0.5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^5$ CFU/mL。实验分 2 组：一组用 1 mg/mL 的抗菌肽与菌液 37℃共同培养 10 min，30 min，1 h，2 h，4 h 和 8 h：另一组菌液中未加抗菌肽，而是加入 2 mg/mL 的 Triton X-100 处理 1 h，使菌体死亡破裂；对照组为稀释菌液。混合液分别经 0.22 μm 纤维素酯微孔滤膜过滤，滤液于紫外分光光度计 260 nm 测定其吸光值，并计算渗透率（$\mathrm{PDL} = \mathrm{OD}/\mathrm{OD}_t \times 100$），OD 为菌液中加入抗菌肽后的吸光值或未加抗菌肽的吸光值，OD_t 为菌液中加入 Triton X-100 处理后的吸光值。滤液用琼脂培养，如有菌生长，则该样品无效，以保证实验结果的准确性。

1.11　透射电镜制样及抗菌肽 MDL-2 对细菌的抑杀作用观察

取对数生长期的细菌，1 000 r/min 离心 10 min，弃上清，无菌生理盐水洗涤，用新鲜培养基稀释成 106/mL 的细菌悬液。取 1 mL 细菌悬液，实验组加浓度为 17.8 μmol/L 的抗菌肽 200 μL，对照组加生理盐水 200 μL，37℃下作用 30 min 和 60 min。2 000 r/min 低温离心，弃上清，用无菌生理盐水洗涤 2 次，加 3%戊二醛固定 2 ~ 4 h，pH 7.2 磷酸缓冲液漂洗数次，再用 1%锇酸固定 1 h 后，用日立 H-7000 透射电子显微镜观察抗菌肽对细菌细胞的杀伤作用。

2　结果与分析

2.1　抗菌肽 MDL-2 的抑菌活性

经 Tricine-SDS-PAGE 得到 6 条差异表达蛋白条带，将这 6 条带回收、复性后，检测抗菌活性，得到 3 种抗菌谱和抗菌活性不同的抗菌多肽（图 1：6，4，3 条带），对其中 1 种抗菌肽（图 1：4）进行了较详细研究，并将其命名为 MDL-2。

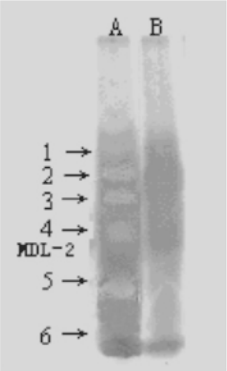

图 1　家蝇幼虫血淋巴诱导蛋白表达差异电泳

Fig. 1　Protein differential expression electropherogram of *Musca domestica* larvae hemolymph

A：诱导后 Immunized tissue homogenization；
B：未诱导 Unimmunized tissue homogenization.

经抑菌活性检测 MDL-2 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌具有较强的抗菌活性。浓度为 0.164 mg/mL 时，MDL-2 抗大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的比活力分别为 1.20 U/mg 和 0.872 U/mg（图 2）。

2.2　抗菌肽 MDL-2 的纯度、分子量和氨基酸组成

经 HPLC 检测均为单一峰，因此表明抗菌肽 MDL-2 达到均一程度。经 Tricine-SDS-PAGE 测定标准分子量的 Rf 值，计算出家蝇幼虫抗菌肽 MDL-2 分子量为 11 kD。分析抗菌肽 MDL-2 的氨基酸组成，结果表明 MDL-2 由 106 个氨基酸组成，富含碱性氨基酸以及脯氨酸、甘氨酸，不含甲硫氨酸和半胱氨酸（表 1）。

2.3　圆二色谱分析

抗菌肽 MDL-2 在水溶液和 SDS 溶液中的圆二色谱检测结果见图 3 和表 2。水溶液中抗菌肽 MDL-2 主要以 β 折叠和无规卷曲的构象存在，α 螺旋和 β 转角含量较少 随着 SDS 的加入，对 α 螺旋结构和 β 转角结构影响较大，β 转角消失，α 螺旋结构含量相对较大提高，β 折叠和无规卷曲变化相对较少。

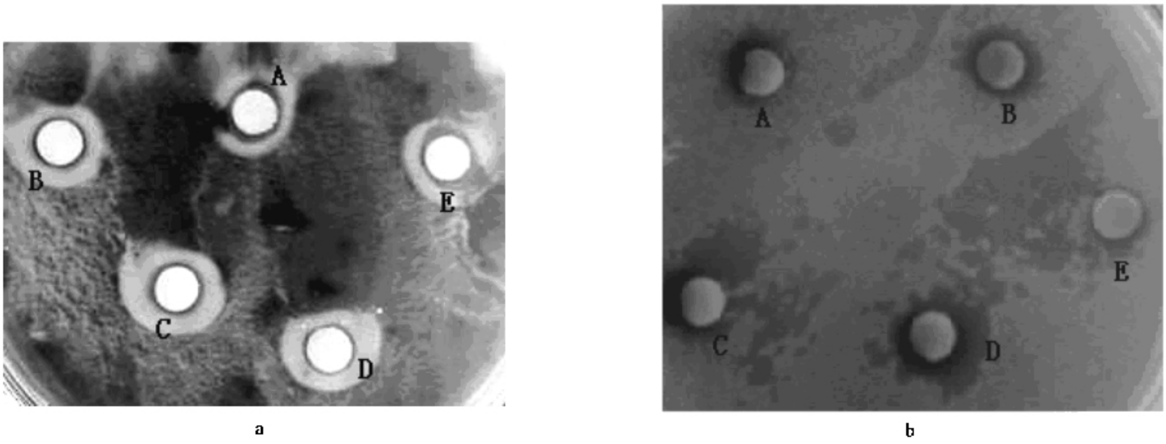

图 2　MDL-2（0.164 mg/mL）对大肠杆菌（a）和金黄色葡萄球菌（b）的抑制作用

Fig. 2　Antibacterial effect of MDL-2（0.164 mg/mL）against *Escherichia coli*（a）and *Staphylococcus aureus*（b）

A ~ E：含 MDL-2 的滤纸片的抑菌圈。A – E were samples with MDL-2.

表 1　抗菌肽 MDL-2 的氨基酸组成

Table 1　Amino acid composition of antibacterial peptide MDL-2

氨基酸 Amino acid	含量 Content（pmol/μL）	残基数 Residues	氨基酸 Amino acid	含量 Content（pmol/μL）	残基数 Residues
Asx*	6.65	4	Val	10.04	6
Glx*	7.09	6	Met	–	0
Ser	15.90	9	Phe	6.05	6
His	2.83	2	Ile	5.61	4
Gly	17.65	8	Leu	6.51	4
Thr	4.83	3	Lys	5.90	4
Ala	8.45	4	Pro	71.49	41
Arg	3.55	3			
Tyr	2.14	2	合计 Total	174.70	106

Asx*：Asn 或 Asp 或 Asn + Asp；Glx*：Gln 或 Glu 或 Gln + Glu；下同。Asx*：Asn/Asp/Asn + Asp；Glx*：Gln/Glu/Gln + Glu. The same below.

表 2　抗菌肽 MDL-2 在不同条件下的二级结构构象单元的含量（%）

Table 2　Percent of the secondary structure conformational unit of antibacterial peptide MDL-2 in different conditions

	MDL-2（Water）	MDL-2（1% SDS）	MDL-2（3% SDS）
α 螺旋 α-helix	7.9	21.9	26.7
β 折叠 β-sheet	49.1	49.6	37.6
β 转角 β-turn	9.8	0	0
无规卷曲 Random	33.2	28.5	35.7

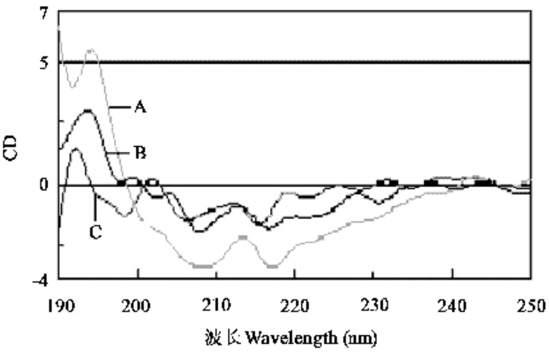

图 3　抗菌肽 MDL-2 在不同条件下的圆二色谱

Fig. 3　Circular dichroism spectra of antibacterial peptide MDL-2 in different conditions

A：3% SDS 溶液 3% SDS solution；B：1% SDS 溶液 1% SDS solution；C：水溶液 Water.

2.4　抗菌肽 MDL-2 对细菌细胞通透性的影响

大肠杆菌和金黄色葡萄球菌经抗菌肽 MDL-2 作用后，与对照相比紫外吸收值明显升高，且随着作用时间的延长呈现上升趋势（图 4：A），相应的通透率大幅度提高，当 MDL-2 作用大肠杆菌 120 min 后渗透率近 50%，作用 240 min 时渗透率近 100%（图 4：B），而当 MDL-2 作用金黄色葡萄球菌 120 min 后渗透率 26%，作用 240 min 时渗透率仅 66%，由此说明 MDL-2 对大肠杆菌的作用较金黄色葡萄球菌敏感、通透性作用较强，与抗菌活性的测定结果相一致。

2.5　抗菌肽 MDL-2 作用大肠杆菌后的透射电镜观察

透射电镜观察结果表明：未经抗菌肽处理的大

肠杆菌和金黄色葡萄球菌的结构完整，表面光滑，而经抗菌肽处理后的细菌细胞壁、细胞膜出现破裂，表面有明显孔洞，原生质严重扩散，随着抗菌肽作用时间的延长菌体完全解体，内容物外泄（图5）。

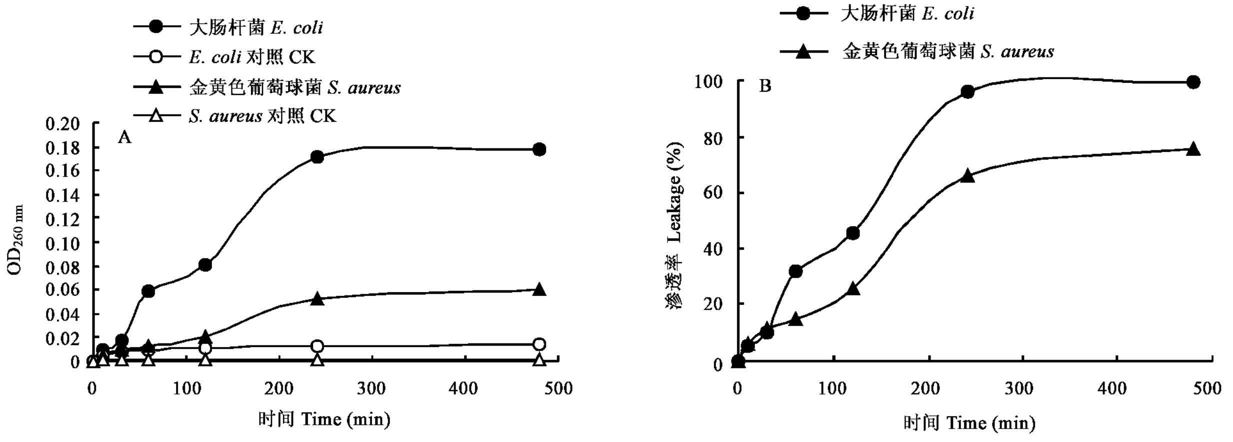

图4 抗菌肽MDL-2对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌通透性的影响

Fig. 4 Effects of MDL-2 on permeability of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*

3 讨论

昆虫抗菌肽的杀菌机理国内外一直在研究之中，至今仍然存在不同的见解，目前比较认同的是Christensen等（1988）的离子孔道学说。

抗菌肽MDL-2富含碱性氨基酸，由于细胞膜的环境和SDS的模拟疏水环境相似，圆二色谱分析MDL-2在含SDS的溶液中α螺旋构象大量增加，而且含有β折叠和无规卷曲，使得MDL-2在形成较强的两亲性空间构象的同时保持一定的分子柔性，这种高级结构特点是抗菌肽与细菌细胞膜相互作用所需要。

细菌属于原核生物，具有细胞壁和细胞膜两种膜系。本实验通过抗菌肽MDL-2作用于细菌细胞的通透性改变和透射电镜超微结构的观察结果进一步表明：抗菌肽MDL-2通过静电引力首先与细胞外膜结合，使光滑的细菌表面有许多突起，细胞壁逐渐裂解，导致细胞形状不规则 抗菌肽形成柔性的两亲空间构象后与细胞内膜作用，扰乱了膜脂分子的排列，改变了细胞膜的通透性，影响细胞膜的结构和功能，在细胞膜上形成了许多孔道，致使细胞内的原生质扩散，并从孔道向胞外渗漏，造成紫外吸收值升高，影响了细菌的代谢系统，随着细菌细胞膜破损，最终引起细胞完全解体，从而起到抑菌、杀菌作用。由此可以推断抗菌肽MDL-2的抗菌机制与Christensen的孔道学说相符。但抗菌肽是否通过孔道进入细胞内，进一步影响细胞的信号传导系和基因的表达？对此还需更深入的研究。

MDL-2对大肠杆菌的抑菌活性和通透性均比对金黄色葡萄球菌的高，这可能由于大肠杆菌属于革兰氏阴性细菌，其细胞壁的结构含有大量的带负电荷的LPS，而金黄色葡萄球菌属于革兰氏阳性细菌，细胞壁的结构含有大量的肽聚糖，且细胞壁较大肠杆菌的厚，抗菌肽MDL-2是带有较多碱性氨基酸残基的阳离子多肽，易于通过静电引力与大肠杆菌细胞结合。

总之，抗菌肽的抗菌机理与通过阻断细菌的大分子生物合成来发挥作用的抗生素的抗菌机理完全不同，细菌不易对抗菌肽产生耐药性（Gazit *et al*.，1994），抗菌肽有可能作为新一代替代抗生素的抗菌药物，因此对家蝇抗菌肽深入研究具有重要理论意义和实际应用价值（Lata *et al*.，2007）。

参考文献（References）

Bai M, Zhou L, 2001. Purification of a kind of antimicrobialprotein from *Musca domestica* (housefly) larvae. *Chin. J. Appl. Environ. Biol.*, 7(6): 568 – 571. [柏鸣，周立，2001. 家蝇抗菌蛋白的分离纯化及部分性质. 应用与环境生物学报，7(6): 568 – 571]

Chen LC, Wang JX, 2001. Purification and characterization of an antimicrobialpeptide from housefly, *Musca domestica*. *Journal of Shandong University*, 36(3): 351 – 357. [陈留存，王金星，2001. 家蝇抗菌肽的分离纯化及性质研究. 山东大学学报，36(3): 351 – 357]

Christensen B, Fink J, Merrifield RB, Mauzerall D, 1988. Channel-forming properties of cecropins and related model compounds incorporated into planar lipid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85(14): 5 072 – 5 076.

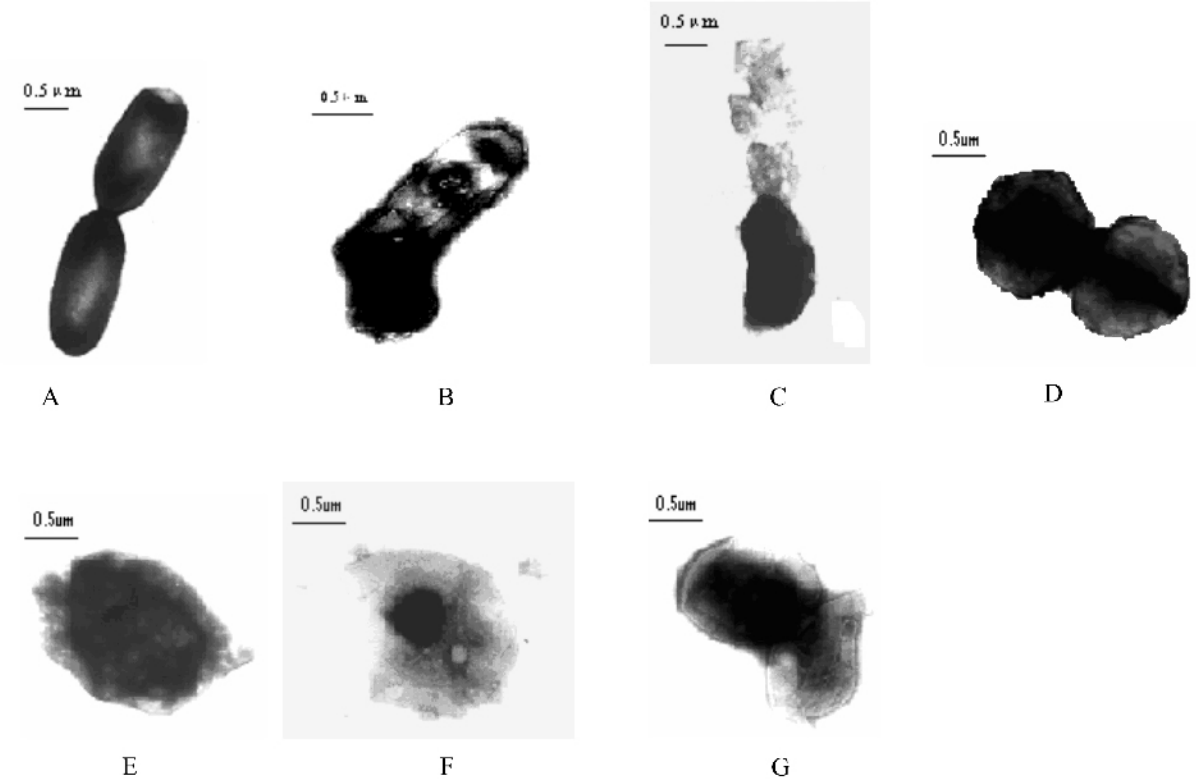

图 5　抗菌肽 MDL-2 作用于大肠杆菌和金黄色葡萄球菌前后的透射电镜观察

Fig. 5　Transmission electron micrographs of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* untreated and after treatment with antibacterial peptide MDL-2

A：**未经抗菌肽处理的正常大肠杆菌的形状，清晰的杆状结构，表面光滑曲线规则** *E. coli* ATCC25922 untreated with MDL-2，bacterial cells kept normal morphology，with plain shape and surface；B：**经** 5 μmol/L **抗菌肽处理** 30 min **后大肠杆菌的细胞壁、细胞膜出现破裂，表面有明显孔洞，原生质扩散** *E. coli* ATCC25922 treated with 5 μmol/L MDL-2 for 30 min，pore were found on the surface，the cytoplasmic contents gradually diffused；C：**经** 5μmol/L **抗菌肽处理** 60 min **后大肠杆菌的细胞壁、细胞膜严重破损，形成碎片，菌体破裂解体，内容物流出** *E. coli* ATCC25922 treated with 5 μmol/L MDL-2 for 60 min，there were many pores that led to the cytoplasmic lysising and rupturing of the cells；D：**未经抗菌肽处理的正常金黄色葡萄球菌的形状，清晰的球形结构** *S. aureus* ATCC6538 untreated with MDL-2，bacterial cells kept normal morphology；E：**经** 5 μmol/L **抗菌肽处理** 30 min **后金黄色葡萄球菌的形状已变的不规则，细胞壁、细胞膜出现破裂，表面有明显孔洞，原生质扩散** *S. aureus* ATCC6538 treated with 5 μmol/L MDL-2 for 30 min，many pore were found on the surface，the cytoplasmic contents gradually diffused；F，G：**经** 5 μmol/L **抗菌肽处理** 60 min **后金黄色葡萄球菌的细胞严重损伤，细胞壁、细胞膜大面积破损，原生质扩散后流出** *S. aureus* ATCC6538 treated with 5 μmol/L MDL-2 for 60 min，there were many pores that led to the cytoplasmic lysising and rupturing of the cells.

Gazit E，Lee WJ，Brey PT，Shai Y，1994. Mode of action of the antibacterial cecropin B2：a spectrofluorometric study. *Biochemistry*，33(35)：10 681－10 692.

Gong X，Le GW，Shi YH，2002. Insect antimicrobialpeptides and its progress in advance on genetic engineering. *Hereditas*，24(5)：591－594. **[宫霞，乐国伟，施用晖，2002. 昆虫抗菌肽及其基因工程研究进展. 遗传，**24(5)：591－594]

Gong X，Le GW，Shi YH，2004. Purification of antimicrobial peptide MDL-1 from *Musca domestica* larvae and its effect on *Escherichia coli* ultrastructure. *Acta Entomol. Sin.*，47(1)：8－13. **[宫霞，施用晖，乐国伟，**2004. **家蝇幼虫抗菌肽** MDL-1 **的分离纯化及其对大肠杆菌超微结构的影响. 昆虫学报，**47(1)：8－13]

Hultmark D，Steriner H，Rasmuson T，Boman HG，1980. Insect immunity：purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur. J. Biochem.*，106：7－16.

Laura M，Romano D，Daniela M，1996. The novel antimicrobial peptides ceratoxin A alters permeability of the inner and outer membrane of *Escherichia coli* K-12. *Current Microbiology*，33：40－43.

Lata S，Sharma BK，Raghava GPS，2007. Analysis and prediction of antibacterial peptides. *BMC Bioinformatics*，8(1)：263.

Qu JM，Huang TR，Qu XC，Li WP，Chen PJ，2007. Purification and biological activities of an antibacterial peptides from housefly. *Chin. J. Vet. Sci.*，27(3)：387－390. **[屈军梅，黄庭汝，屈孝初，李文平，陈平洁，**2007. **家蝇抗菌肽的分离纯化及生物学活性. 中国兽医学报，**27(3)：387－390]

Rao JH，Zhou YF，Yang JC，Wu XP，Zheng Q，Huang ZR，1999. Studies on properties of immunized hemolymph of *Musca domestica* L. *Natural Enemies of Insects*，21(3)：121－125. [**饶军华，周永富，阳建春，吴晓萍，郑青，黄自然**，1999. **家蝇免疫血淋巴的性质研究**. **昆虫天敌**，21(3)：121－125]

Schagger H，von Jagow G，1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*，166：368－379.

Sheng CZ，An CJ，Geng H，2002. Separation and purification of a heat-stable antibacterial peptide of the larvae of housefly. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis*，35(4)：7－10. [**盛长忠，安春菊，耿华**，2002. **一种家蝇幼虫热稳定抗菌肽的分离纯化**. **南开大学学报(自然科学)**，35(4)：7－10]

Steiner H，1982. Secondary structure of the cecropins antibacterial peptides from the moth *Hyalophora cecropia*. *FEBS Letters*，137：283－287.

Wang CY，Zuo XF，1997. The assay of composition and physicochemical characteristics of antibacterial matters from housefly larvae. *Acta Microbiologica Sinica*，32(2)：148－153. [**王程远，左晓峰**，1997. **家蝇幼虫抗菌物质组成及其理化性质**. **微生物学报**，32(2)：148－153]

Wang JZ，Fan M，2001. The Technical Handbook about Protein. Beijing：Science Press. 42－46. [**汪家政，范明**，2001. **蛋白质技术手册**. **北京：科学出版社**. 42－46]

(责任编辑：黄玲巧)